РЕЗЮМЕ

В работе представлены данные по изучению репродукции вакцинного вируса чумы мелких жвачных штамма «ВНИИЗЖ» в перевиваемой культуре клеток гонады козы в зависимости от величины инфицирующей дозы, состава поддерживающей среды и способа заражения.

SUMMARY

Data on studying the reproduction of «ARRIAH» strain of peste des petits ruminants vaccine virus in caprine gonad cell culture (Ch-91) depending on the amount of an infectious dose, maintenance medium composition and route of infection are demonstrated in the paper.

Литература

1. Изучение культуральных свойств вакцинного штамма 45G37/35-К вируса чумы мелких жвачных / И.П. Михалкин, Т.Ф. Горшкова, Л.И. Анисимова [и др.] // Науч. основы произв-ва вет. биол. препаратов. Щелково, 2005. С. 163-166.
2. Изучение чувствительности различных клеточных культур к вирусу чумы мелких жвачных животных / В.И. Диев, Л.Н. Соколов, Р.В. Мамкова [и др.] // Вирусные болезни с.-х. ж-ных: тез. докл. науч.–практ. конф. Владимир, 1995.- С. 94.
3. Михалкин, И.П. Чума мелких жвачных / И.П. Михалкин //Сибирская язва и другие опасные инфекционные болезни животных. Покров, 2005. С. 159-163.
4. Attenuation une souche de virus de la peste des petits ruminants: candidat peour un vaccin homologue vivant / A. Diallo, W.P. Taylor, P.C. Zefevre, A. Provost // Revue Elev. Med. Vet. Pays Trop. 1989. Vol.42, №3. P. 311-319.
5. Lefevre, P.-C. Peste des petits ruminants / P.-C. Lefevre, A. Diallo // Rev. sci. tech. Off. Epiz. 1990.- Vol. 9, №4. P. 951-965.

УДК 619:616.98:578.823.91:636.22/.28:573.6.086.83:57.083.3

Г.С. Скитович, О.П. Бьядовская, Л.Б. Прохватилова

РАЗРАБОТКА НЕПРЯМОГО ВАРИАНТА ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИТЕЛ К РОТАВИРУСУ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ КРС МЕТОДОМ ОДНОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Введение

Ротавирусы являются наиболее распространенным этиологическим агентом острых гастроэнтеритов КРС. Ущерб, причиняемый ротавирусами, слагается из отставания в росте и гибели молодняка, особенно ощутим в животноводческих хозяйствах промышленного типа. Результаты проведенных за последние годы исследований свидетельствуют о широком распространении данной инфекции в хозяйствах РФ [1, 2, 3].

Важным условием успешной борьбы с инфекцией является своевременная диагностика заболевания, для чего используются различные диагностические методы, в том числе иммуноферментный анализ (ИФА), главным достоинством которого является высокая чувствительность. Лабораторная диагностика ротавирусной инфекции КРС, кроме выявления антигена, предусматривает также выявление антител.

Целью нашей работы была разработка непрямого варианта иммуноферментного анализа для выявления антител к ротавирусу в сыворотках крови КРС при исследовании их в одном разведении.

Материалы и методы

В качестве антигена в работе использовали очищенный, концентрированный ротавирус КРС штамм ТЕ-87-ДЕП, полученный в культуре клеток МДВК.

Использовали сыворотки крови КРС из различных хозяйств России (290 образцов), а также контрольные положительные и отрицательные сыворотки, полученные от экспериментально инфицированных животных.

Для выявления специфического комплекса использовали коммерческий препарат антител против IgG (H+L) быка, меченных пероксидазой (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, г. Москва).

Антиген разводили в 0,1М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,5-9,6. Для заполнения сайтов неспецифического связывания на твердофазном сорбенте применяли раствор 0,05 М трис-HCl с 0,2 М NaCl, 0,01% твин-20, 10% лошадиной сыворотки. Разведение сыворо-

Таблица 1

Константы линий регрессии для трех отдельных разведений

Разведение сыворотки	Коэффициент корреляции (R)	A'	B'
1:80	0,87	0,5276	0,30043
1:160	0,91	0,5254	0,31138
1:320	0,90	0,6140	0,33554

Таблица 2

Результаты измерения оптической плотности положительного и отрицательного контролей

	Отрицательный контроль (NCx)	Положительный контроль(PCx)	Разница между контролями (P-N)
Среднее значение	0,102 ± 0,040	0,318 ± 0,124	0,308 ± 0,115
Доверит. интервал	0,142 ÷ 0,062	0,486 ÷ 0,194	0,423 ÷ 0,193

ток и конъюгата, а также отмывку несвязавшихся компонентов реакции проводили раствором 0,05 М трис-HCl с 0,2 М NaCl, 0,01% твин-20, рН 7,4-7,6. В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали раствор АБТС (фирмы MP Biomedicals, Inc., France).

Сенсибилизацию планшетов проводили путем внесения в каждую лунку планшета по 50 мкл раствора антигена. Планшет инкубировали в течение 18-20 часов при температуре +4° С. После удаления несвязавшихся компонентов в лунки вносили по 50 мкл 10% раствора лошадиной сыворотки на буферном растворе TBS. Инкубировали в течение 1 часа при температуре +37° С. После отмывки в лунки сенсибилизированного планшета вносили поэтапно исследуемые сыворотки крови, антивидовой коньюгат в рабочем разведении (1: 3500), раствор субстрата. Все реагенты, включая субстрат, вносили в объеме 50 мкл на лунку и инкубировали при +37° С в течение 1 часа. Между этапами реакции несвязавшиеся компоненты удаляли путем промывания планшета 3-4 раза раствором для отмывки. Через 15-20 мин после окрашивания реакцию останавливали путем внесения 50 мкл 1% раствора ДСН. Измерение абсорбции исследуемых проб проводили спектрофотометрически при длине волны 405 нм («Униплан», г.Москва).

Все испытуемые пробы исследовали в трех повторностях.

Было протестировано 290 сывороток крови КРС, полученных из хозяйств различных областей РФ, при этом все сыворотки раститровывали методом последовательных двукратных разведений.

Титром испытуемой сыворотки считали последнее ее разведение, в котором значение оптической плотности вдвое превышало среднее значение оптической плотности отрицательного контроля.

Значение оптической плотности 290 исследуемых сывороток было определено для трех различных разведений: 1:80, 1:160, 1:320.

По измеренным оптическим плотностям (ОП) положительной контрольной (ПК) сыворотки рассчитывали величину S/P (4), которая выражалась в виде:

S/P=ИС/КП **(1)**, где

ИС – оптическая плотность исследуемой сыворотки,

КП – оптическая плотность положительного контроля.

Зависимость между величиной (S/P) и значением титра сыворотки (определенным заранее) выражалась формулой:

Lg(S/P)=A'+B'*lg(T) **(2)**, где

А, В – коэффициенты реакции, установленные опытным путем.

Для обработки данных ИФА использовали компьютерную программу STATISTICA, версия 4.3 (StatSoft, Inc., 1993), которая регрессионным анализом (приближение функций по методу наименьших квадратов) позволяла рассчитывать значения параметров уравнения A', B', значение коэффициента корреляции R, стандартную ошибку и построить линию регрессии.

Результаты и обсуждение

Разработка непрямого варианта иммуноферментного анализа (н-ИФА) для тестирования сывороток крови КРС в одном разведении включала в себя выбор оптимального разведения сыворотки и установление позитивно-негативного порога (ПНП) для точной интерпретации данных.

Для определения оптимального разведения сыворотки предварительно методом последовательных разведений тестировали сыворотки крови КРС с различным уровнем антител к ротавирусу (290

Таблица 3

Результаты сравнительного исследования сывороток крови в двух тест-системах

Результаты в наборе INGEZIM ROTAVIRUS		Положительные результаты в непрямом ИФА	Отрицательные результаты в непрямом ИФА
Положительные	43[в]	41[а]	2
Отрицательные	18[д]	1	17с
Всего	61	42	19

Примечание: относительная чувствительность вычислялась как А/Вх100%, где А – количество проб при тестировании в непрямом варианте, совпадающих с положительными пробами в INGEZIM ROTAVIRUS. Специфичность вычислялась как С/Дх100%, где С – количество отрицательных результатов в непрямом варианте, совпадающих с отрицательными пробами в INGEZIM ROTAVIRUS, Д – количество отрицательных проб в INGEZIM ROTAVIRUS.

сывороток). Для разведений 1:80, 1:160 и 1:320 вычисляли значения S/P: S/P 80, S/P 160, S/P 320 (табл. 1).

Наиболее высокий коэффициент корреляции был получен для разведения 1:160. Поэтому данное разведение было выбрано нами в качестве рабочего. Уравнение регрессии будет верным при определенных значениях оптической плотности контрольных сывороток. Для их определения были проанализированы соответствующие значения оптической плотности положительной (PCx) и отрицательной (NCx) контрольных сывороток и разницы между ними (PCx - NCx), исследованных в разведении 1:160 (табл. 2). Данные, представленные в таблице, показывают, что допустимые значения оптической плотности контрольных сывороток должны быть следующие: для отрицательного контроля не выше 0,142; допустимая разница между контролями больше 0,3.

Если оптическая плотность контрольных сывороток выходит за рамки допустимых значений, результаты реакции будут считаться сомнительными, и пробы должны быть повторно проанализированы.

Для интерпретации результатов реакции необходимо было установить позитивно-негативный порог (ПНП). 18 сывороток крови КРС, показавших отрицательный результат при исследовании их в коммерческом наборе INGEZIM ROTAVIRUS («Ingenasa», Испания), исследовали методом последовательных разведений. ПНП определяли, рассчитывая средние значения оптической плотности отрицательных сывороток для каждого разведения, прибавляя три значения стандартного отклонения.

Принимая во внимание среднюю величину оптической плотности отрицательных сывороток в данном разведении, с учетом трех стандартных отклонений, по формуле (1) вычисляли значение S/P, соответствующее позитивно-негативному порогу. Было установлено, что сыворотки, тестируемые при 1:160, следует считать отрицательными, если S/P<0,45, и положительными, если S/P>0,60. Существующий между ними интервал значений соответствовал сомнительным результатам.

Было проведено сравнение разработанного нами метода с набором INGEZIM ROTAVIRUS («Ingenasa», Испания), для чего рассчитывали относительную чувствительность и специфичность тест-системы. Результаты представлены в табл. 3.

Относительная чувствительность непрямого варианта ИФА составила 95,3%, относительная специфичность – 94,4%.

Выводы

Таким образом, была разработана тест-система для выявления антител к РВ КРС в сыворотках крови, определен позитивно-негативный порог и оптимальное разведение сывороток, показаны относительная чувствительность и специфичность предложенного метода.

Разработанная тест-система может быть использована для оценки иммунного статуса поголовья КРС после проведения вакцинации, а также для оценки уровня инфицированности животных при отсутствии специфической профилактики.

Определение титра сыворотки по одному ее разведению позволило увеличить число исследуемых проб и сократить срок исследований.

РЕЗЮМЕ

Разработан непрямой вариант иммуноферментного анализа для количественного определения антител к ротавирусу в сыворотках крови крупного рогатого скота (КРС) методом одного разведения. Уравнение стандартной кривой, полученное методом линейной регрессии, использовали для предсказания титров по S/P отношению, измеренному в одном разведении сыворотки. Определены интервалы допустимых значений оптической плотности контрольных отрицательной и положительной сывороток, позитивно-негативный порог. Специфичность и чувствительность метода сравнивали с коммерческим набором INGEZIM ROTAVIRUS («Ingenasa», Испания). Разработанную тест-систему использовали для исследования сывороток, полученных из различных хозяйств РФ.

SUMMARY

The indirect ELISA for quantitative evaluation of antibodies against rotavirus in bovine blood sera using a method of single dilution was developed. The equation of a standard curve obtained by the method of linear regression was used for the prediction of titers using S/P ratio measured in a single dilution of serum. The intervals of permissible values of optical density of control negative and positive sera as well as a positive-negative threshold were determined. The specificity and sensitivity of the method were compared with those of the commercial kit INGEZIM ROTAVIRUS («Ingenasa», Spain). The developed test-system was used for the investigation of sera received from different holdings of the RF.

Литература

1. Выделение ротавируса крупного рогатого скота в культуре клеток / Г.Н. Дороненкова, С.А. Чупин, А.М. Тимина [и др.] // Биотехнология. 2004. №4. С. 47-52.
2. Серийное пассирование ротавируса крупного рогатого скота в гетерологичной культуре клеток / Л.Г. Рамишвили, Г.Г. Рухадзе, Е.А. Непоклонов [и др.] // Вопр. вирусол. 1991. №6. С.521-523.
3. Скибицкий, В.Г. Серологическое обследование крупного рогатого скота на наличие противоротавирусных антител / В.Г. Скибицкий, О.Г. Проценко // Профилактика и меры борьбы с болезнями молодняка с.-х. животных: тез. докл. науч. произв. конф. Минск, 1990. С.10.
4. Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay. 2. Comparison of computation methods for measuring antibody titres in a single serum dilution / D.B. Snyder, W.W. Marquardt, E.T. Mallison [et al.] // Avian Dis. 1982. Vol.27. P. 474-484.

УДК 619:616.98:578.333.3:57.082.26

А.В. Кононов, С.В. Левченко, О.Г. Андреева, О.П. Бьядовская

ОЧИСТКА И КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ВИРУСА ДИАРЕИ-БОЛЕЗНИ СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Введение

В настоящее время вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (ВД-БС КРС) занимает существенное место в ряду инфекционных заболеваний КРС. Возбудитель ВД-БС КРС является прототипным представителем рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* и вызывает у КРС широкий спектр клинических проявлений: аборты, диарею, респираторные заболевания и др. [3].

Изучение иммунобиологических свойств и проведение технологического контроля производства инактивированных вакцин основано на использовании иммунохимических реакций и требует наличия диагностических антигенов и препаратов антител.

Одним из наиболее существенных моментов приготовления диагностикумов и вакцин является получение очищенной концентрированной суспензии вируса.

В литературе имеются сообщения о различных способах очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС. Концентрирование вирусных агентов проводят осаждением с использованием полиэтиленгликоля [1, 2, 6]. Более детальную очистку и концентрирование проводят, используя метод осаждения в изоэлектрической точке, а также применяя обработку детергентами (тритон Х-100) или суспендирующим буфером, содержащим двухвалентные катионы [4, 5].

Целью нашего исследования явился подбор оптимальных методов и условий очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС штамм «NADL».

Материалы и методы

Для очистки и концентрирования вируса ВД-БС КРС нами выбраны следующие методы: осаждение вируса полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000) с последующей очисткой сахарозой, осаждение вируса ультрацентрифугированием, применение детергентов в процессе очистки и концентрирования вируса.

Для концентрирования использовали ПЭГ-6000 в виде 50% стерильного раствора, в качестве детергентов применяли Triton X-100 и Tween-20. Очистку вирусосодержащей суспензии, для освобождения от чужеродных белков, проводили с использованием 20% сахарозы.

В работе использовали штамм «NADL» вируса ВД-БС КРС, адаптированный к культуре клеток носовых перегородок КРС (ВТ) с титром инфекционной активности 106,75 ТЦД$_{50}$/0,2 см^3, который был получен из коллекции АТСС (США).